



Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten internationalen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the international patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet international spécifiée à la page suivante.

Den Haag, den
The Hague,
La Haye, le

07 FEB 2005

Der Präsident des Europäischen Patentamts
Im Auftrag
For the President of the European Patent Office
Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.


L. Bonomelli

Patentanmeldung Nr.
Patent application no.
Demande de brevet n°

PCT/EP 03/14578

BEST AVAILABLE COPY

att 2 der Bescheinigung
heet 2 of the certificate
ge 2 de l'attestation

meldung Nr.:
plication no.:
mande n°:

PCT/EP 03/14578

melder:
plicant(s):
mandeur(s):

1. SHESTAKOV, Vitali, Alexandrovich - Moskau, Russische Föderation
2. HANZ, Christoph - Monaco, Monaco

zeichnung der Erfindung:
e of the invention:
re de l'invention:

Methode zur Gewinnung eines biologisch aktiven mit Elektroschock behandelten
Blutserums und seine Verwendung

meldetag:
te of filing:
te de dépôt:

18. Dezember 2003 (18.12.2003)

Anspruch genommene Priorität(en)
riority(ies) claimed
orité(s) revendiquée(s)

aat:
ate:
ys:

Tag:
Date:
Date:

Aktenzeichen:
File no.
Numéro de dépôt:

ennung von Vertragsstaaten : Siehe Formblatt PCT/RO/101 (beigefügt)
signation of contracting states : See Form PCT/RO/101 (enclosed)
signation d'états contractants : Voir Formulaire PCT/RO/101 (ci-joint)

merkungen:
marks:
marques:

PCT-ANTRAG

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 18.12.2003 04:26:23 PM

IV-1	Anwalt oder gemeinsamer Vertreter, oder besondere Zustellanschrift Die unten bezeichnete Person ist/wird hiermit bestellt, um den (die) Anmelder vor den internationalen Behörden zu vertreten, und zwar als:	Anwalt
IV-1-1	Name (FAMILIENNAME, Vorname)	BABELUK, Michael
IV-1-2	Anschrift:	Mariahilfer Gürtel 39/17 A-1150 WIEN Österreich
IV-1-3	Telefonnr.	+ 43 1 892 89 33
IV-1-4	Telefaxnr.	+ 43 1 892 89 333
IV-1-5	e-mail	patent@babeluk.at
V	Bestimmung von Staaten	
V-1	Regionales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	<p>AP: BW GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat des Harare-Protokolls und Vertragsstaat des PCT ist</p> <p>EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist</p> <p>EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist</p> <p>OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat der OAPI und Vertragsstaat des PCT ist</p>
V-2	Nationales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	<p>AE AG AL AM AT (Patent und Gebrauchsmuster) AU AZ BA BB BG BR BW BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE (Patent und Gebrauchsmuster) DK DM DZ EC EE EG ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW</p>

Methode zur Gewinnung eines biologisch aktiven mit Elektroschock behandelten Blutserums und seine Verwendung

Die vorliegende Erfindung gehört zur Medizin und wird zur Gewinnung eines biologisch aktiven und mit Elektroschock behandelten Blutserums verwendet, welches sich bei einigen Erkrankungen und Störungen des menschlichen und tierischen Organismus als nützlich erweist (Energiewechsel und Gehalt an zyklischer Adenosinmonophosphorsäure im Hirngewebe, Langzeitgedächtnis, Epilepsie usw.) Weiters wird die Verwendung des erfindungsgemäßen Blutserums zur Regulierung der Proliferation unterschiedlicher menschlicher Tumorzellen behandelt.

Stand der Technik

Bekannt ist ein Verfahren zur Gewinnung einer aktiven Substanz aus Blutserum, dem die Entnahme des Bluts von Menschen und Tieren, die Inkubation sowie die Absonderung der aktiven Substanz mit anschließender Konservierung zugrunde liegt. Diese Methode betrifft die Gewinnung eines Blutserums, das die Widerstandsfähigkeit des Körpers in bezug auf exogene und endogene Faktoren wie Luftdruck, Lufttemperatur, Schwerkraft, Licht etc. sowie Hunger, Durst, Schlaf- und sexuelle Bedürfnisse usw. erhöht (sh. JP 2123287, EP 0 542 303; RU 2096041, RU 2120301).

Das Blutserum wird hierbei von einem Spender entnommen, der zuvor in einen bestimmten funktionellen Zustand versetzt wird. Dabei wird je nach Einwirkungsgrad Blutserum mit unterschiedlicher biologischer Aktivität gewonnen, und zwar mit miogener, somnogener, ophthalmogener, audioaktiver, thermoaktiver, diätaktiver, sexaktiver, antihypoxischer, Antialkohol- und Antinikotinaktivität.

Ein anderes Verfahren, veröffentlicht in der EP 1 283 047, beschreibt die Behandlung von tierischem Blutserum, welches einer Gamma-Bestrahlung ausgesetzt wird mit dem Ziel, die biologische Aktivität zu erhöhen.

Die vorliegende Erfindung stellt eine Weiterentwicklung dieser Methoden dar und behandelt die unterschiedlichen Verwendungen des gewonnenen Blutserums.

Gegenwärtig wird nach peptidartigen Substanzen gesucht, welche die Zellproliferation unterschiedlicher menschlicher Gewebearten regulieren. Sowohl Stimulatoren als auch Inhibitoren der Zellteilung der normalen und pathologisch somatischen Zellen sowie Nervenzellen werden vielseitig erforscht [sh. Aschmarin I.P., "Neurochemie", Moskau, Verlag des Biomed. Chem. Instituts an der Russischen Akademie der Wissenschaften, 1996].

Es wurde festgestellt, dass neben den allgemeinen Aktivierungsfunktionen der peptiden Wachstumsfaktoren - Mitosestimulation, Zelldifferenzierung und Zellwachstum unterschiedlicher Arten des Normalgewebes, schneller Wundheilung - Wachstumspeptide zur Tumorbildung führen können [sh. Bouneres P. // Growth hormone effects on carbohydrate and Lipid metabolism. Horm. Res., 1993, Vol 40, P. 31; Robinson C. // Growth factors: therapeutic advances in wound healing. Ann. Med., 1993, Vol 25, P. 535; Dieguez C., Casanueva F. // Influence of metabolic substrates and obesity on growth hormone secretion. Trends Endocrin. Metab., 1995, Vol.6, P.55; Menster D., Herrmann J., Nicolson J// The role of tropic factors and autocrine/paracrine growth factors in brain meta.]

Unter anderem fördern derartige Peptide wie das parathyroide Peptid, Gastrin, Bombesin die Entwicklung von Tumorzellen sowie die Entstehung von Brust-, Knochen- und Darmkrebs [sh. Kitazawa S., Maeda S., Development of skeletal metastases // Clin. Orthop, 1995, V. 312, P. 45-50; Kaji et al., Carbokyl - terminal peptides from parathyroid hormone-related protein stimulate osteoclast - like cell formation //Endocrinology, 1995, V. 136, P. 842-847].

Obwohl gewisse Peptide die normale Zellteilung begünstigen und Verhaltensstimulatoren für Mensch und Tier sind, besteht bei ihrer Verwendung die Gefahr der Bildung von Tumorzellen und der Entwicklung von Krebskrankheiten.

Frühere Untersuchungen haben ergeben, dass die Elektroschockstimulation von Tieren zur Erhöhung des Betaendorphin-Spiegels im Blut führt [sh. Litvinova S.V., et al. Action of beta-endorphin antiserum of different antibody titer on thermal or tail-shock pain in rats// Biomed Scie-1990, V. 1/5 - P.471-474.]. In seinem Übersichtswerk liefert W.I. Udowitschenko zahlreiche Daten darüber, dass der Schock beliebiger Ätiologie wie z.B. der Elektroschock sowohl bei Menschen als auch bei Tieren die Konzentration an Betaendorphin-, Meta- und Leu-enkephalinen im Blut deutlich erhöht [sh. Udowitschenko W.I. "Das endogene opioide System beim Schock" Pathologische Physiologie und experimentelle Therapie, 1989, Nr. 6, S. 72-77].

Aus unseren Untersuchungen geht hervor, dass das nach Elektroschock entnommene tierische Serum (Substanz S1) mit endogenen Peptiden einer Molekularmasse von bis zu 10-14 kDa (sh. EP 1 283 047) angereichert ist und das Hörvermögen bei gehörlosen Tieren stimuliert [sh. "Einfluss der Substanz S1 auf Ratten mit gesenktem Hörvermögen"// Exper. Biol. Und Medizin, 2002, Nr. 1, S. 42-43].

Aufgabe der vorliegenden Erfindung

Das Ziel der vorliegenden Erfindung besteht in der Schaffung einer neuen Methode zur Gewinnung eines biologisch aktiven Blutserums aus Hühnerblut.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung liegt in der Entwicklung einer Arzneimittel-form für ein neues, biologisch aktives Blutserum.

Die Erfindung geht von diversen Arzneimittelformen aus: unter anderem der peroralen, parenteralen, nasalen und buccalen Verabreichung sowie in Form von Suppositorien und ähnlichen Arten.

In der Erfindung ist die Verwendung von geeigneten und physiologisch vertretbaren Medien (wie z.B. destilliertem Wasser) und Füllmitteln (z.B. Kakaobutter) vorgesehen.

Das mit Elektroschock behandelte biologisch aktive Blutserum kann sowohl selbständig als auch in Verbindung mit anderen biologisch aktiven Mitteln verwendet werden.

Ein zusätzliches Ziel der Erfindung ist eine pharmazeutische Komposition, bei der die aktive Substanz gemäß der vorliegenden Erfindung als Agens auftritt. Dabei muss die pharmazeutische Komposition einen aktiven Bestandteil in einer Menge aufweisen, die ausreicht, um eine günstige Wirkung auf den Organismus des Patienten auszuüben, d.h. eine effektive Menge.

Ein weiteres Ziel der Erfindung ist die Ermittlung der effektiven Dosis der aktiven Substanz gemäß der vorliegenden Erfindung. Vermutlich liegt diese Dosis im Bereich 95 bis 105 mg/kg Körpergewicht des Patienten. Die konkrete Dosis soll daher vom behandelnden Arzt ausgehend vom Zustand des Patienten, seinem Alter, seinem Gewicht und der Behandlungsart festgelegt werden.

Ein weiteres Ziel der Erfindung ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Blutserums zur Regulierung der Proliferation unterschiedlicher menschlicher Tumorzellen. Folgende Zellen wurden verwendet: Zellen des humanen T-Zell-Lymphoms der Linie Jurkat, Zellen des humanen B-Zell-Lymphoms der Linie Raj, Zellen der humanen Melanomzellen der Linie Bro, Zellen des Gebärmutterhalskarzinoms der Linie HeLa, Zellen des Adenokarzinoms der Milchdrüse der Linie MCF-7, Zellen des Osteosarkoms der Linie Mg63 und des Fibrosarkoms der Linie HT1080, Zellen des Neuroblastoms IMR-32 und des Hepatokarzinoms der Linie HepG2. Es wurde somit die Wirkung der Substanz auf die Lymphoidzellen (Jurkat und Raj), Epitheloidzellen (HeLa und MCF-7), Zellen der neuronalen Herkunft (IMR-32), Zellen des Bindegewebes (Mg63 und HT1080) sowie Mesenchymzellen (HepG2) erforscht. Als Normalzellen wurden die in vitro stimulierten Lymphozyten des peripheren menschlichen Bluts verwendet.

Kurzbeschreibung des Inhalts der Erfindung

Die Behandlung von Hühnern mit Elektroschock und die Bearbeitung des Blutserums mit Gamma-Strahlen führen zu einer bedeutenden Erhöhung der biologischen Aktivität, die viele Körperfunktionen des Patienten positiv beeinflusst.

Gleichzeitig ist jedoch bekannt, dass Elektroschocks große Störungen sämtlicher lebenswichtiger Funktionssysteme des Organismus, vor allem des zentralen Nerven-, des Herz-Kreislauf-, des Atmungssystems und des Blutkreislaufes hervorrufen. [sh. Orlov A.N., Sarkowow M.A., Butenko M.W. – Elektrotrauma, M., Medizin, 1977].

Ebenfalls wurde festgestellt, dass Blut und aus Blut hergestellte Präparate bestahlungsempfindlich und nicht beständig sind sowie unter Einfluss der ionisierten Strahlung deaktiviert werden. [sh. // Radiomedizin – M., Atomisdat – 1972. S.123-125; Gergely J., et. Al. Studies of gamma-ray irradiated human immunoglobulin G.// Radiosterilization of Medical Products, - 1967. Vienna. – P. 115-124].

Alle diese Studien gemeinsam haben nicht die Ergebnisse gebracht, die von den Autoren der vorliegenden Erfindung erzielt wurden.

Es stellte sich heraus, dass wenn man venöses oder arterielles mit Elektroschock II.-III. Grades behandeltes Hühnerblut 24 Stunden lang bei niedrigen Temperaturen (circa 4-8°C) inkubiert und im Anschluss daran nach der Blutgerinnselfretraktion und seiner Separation ein Serum gewinnt, lyophilisiert und mit ca. 20-30 (25±5) kGy bestrahlt, so erhält man ein aktives Blutserum (darauf wird in späterer Folge eingegangen).

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

Nachfolgend wird die Erfindung in den bevorzugten Varianten der konkreten Ausführung eingehend geschildert. Dabei sollen die angeführten Beispiele der aktiven Substanzen und Gewinnungsverfahren, der pharmazeutischen Kompositionen und Arzneimittelformen keinen Grund zur Einschränkung der Ansprüche darstellen, sondern sie sind lediglich dazu gedacht, die Machbarkeit der Erfindung sowie die Umsetzung der genannten Zweckbestimmung(en) vorzuführen. Jeder Fachmann auf diesem Gebiet wird sich sicherlich davon überzeugen, dass für die hier angeführten Optionen der Erfindungsführung zahlreiche Modifikationen vorgeschlagen werden können, die allesamt unter die Ansprüche fallen, welche weiter unten angeführt werden.

1. Methode zur Gewinnung vom mit Elektroschock behandeltem Hühnerblut

Zur Serumgewinnung verwendet man das mit dem Elektroschock II.bis III. Grades behandelte Hühnerblut (elektrischer Strom 80-120 Volt, Frequenz 50 Hertz, Stromstärke 0,05 Ampere, Einwirkdauer: 3-4 Sek. lang im Kopfbereich). Das Blut wurde aus der arteria carotis entnommen und in weiterer Folge bei 4-8°C 18-24 Stunden in Polyäthylengläschen inkubiert. Nach der vollständigen Blutgerinnselfretraktion wurden die Fläschchen 20-30 Minuten lang bei 3000 U/Min. zentrifugiert, das Serum wurde von Blutgerinnselfen getrennt und unter gewöhnlichen Verhältnissen lyophilisiert. Die Fläschchen mit dem lyophilisierten Serum wurden auf RZ-100 M-Anlagen bei 20 bis 30 kGy, bevorzugt bei etwa 25 kGy unter Verwendung von Co⁶⁰ bestrahlt. Das auf diese Weise gewonnene Serum wurde bei einer Temperatur von 4-8°C gelagert.

2.1. Beweise für die stimulierende Wirkung des mit Elektroschock behandelten Hühnerblutserums

Die Versuche wurden an Ratten der Linie Wistar, und zwar Männchen mit Körpermasse 280-300 g durchgeführt. Die Tiere wurden in 4 Gruppen zu je 10 Ratten eingeteilt.

In der ersten Gruppe wurde den Ratten 1,0 ml der physiologischen Lösung verabreicht. Den Ratten der zweiten Gruppe wurde Serum in einer Dosierung von $100 \pm 5,0$ mg/kg des Körpergewichts (Umfang 1,0 ml) verabreicht. 30 Minuten nach der Injektion wurden die Ratten dekapitiert.

Den Ratten der dritten Gruppe wurde 1,0 ml der physiologischen Lösung verabreicht und den Ratten der vierten Gruppe Serum ($100 \pm 5,0$ mg/kg Körpergewicht) in einem Umfang von 1,0 ml. 30 Minuten nach der Injektion wurden die Tiere mit einem am Schwanz befestigten Gewicht (10% des Körpergewichts der Ratte) in ein Gefäß mit Wasser (25°C) gesetzt. Nach ersten Anzeichen der Agonie wurden die Tiere aus dem Wasser herausgenommen und dekapitiert.

Als Muster wurden Hirn, Herz, Leber (als Organe mit einer intensiven energetischen Überlastung in Prozessen der extremen Adaptierung) sowie die Skelettmuskulatur (als Hauptträgerorgan) verwendet. Die Gewebsmuster jeder Ratte wurden abgewogen, mit einer isotoni-schen NaCl-Lösung abgekühlt und mit Flüssigstickstoff schnell eingefroren. Die Gesamtzeit der "Belastung" bis zum Ende der Probenentnahme betrug max. 5-6 Minuten.

In den Skelettmuskeln der Ratten wurden Adenosintriphosphorsäure, Adenosindesophosphorsäure und Adenosinmonophosphorsäure bestimmt. Nukleotide wurden mittels Ionenaustauschchromatographieverfahren auf Säulen unter Anwendung von Anionit Dowex 1 getrennt. Die Mengenbestimmung des Adenosintriphosphorsäure-, Adenosindesophosphorsäure- und Adenosinmonophosphorsäuregehalts wurde spektrophotometrisch (Spektrophotometer Hitachi-557) in einer 256 Nm Reichweite durchgeführt.

Das Energiepotenzial wurde nach folgender Formel berechnet:

$$(\text{ATP} + 0,5\text{ADF}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}).$$

Die Mengenbestimmung des Gehalts an zyklischer Adenosinmonophosphorsäure in Hirn, Herz und in Leber wurde mittels radioimmunologischer Analyse mit einem speziellen Gerät der Firma Amersham (Großbritannien) durchgeführt.

Die Bestimmung der markierten Adenosinmonophosphorsäure erfolgte unter Verwendung des Szintillator-Rechners GS-8.

Forschungsergebnisse

Die unterschiedlichen Gehalte an Adenosintriphosphorsäure, Adenosindesophosphorsäure und Adenosinmonophosphorsäure und die Erhöhung des Energiepotentials sind sowohl beim Vergleich der dritten Gruppe mit der Kontrollgruppe und der 2. Gruppe ($p < 0,05$) als auch der vierten Gruppe mit der Kontrollgruppe und der zweiten Gruppe ($p < 0,05$) sowie beim Vergleich der dritten und vierten Gruppe untereinander ($p < 0,05$ Tabelle 1) offensichtlich.

Tabelle 1: Gehalt an Adenosintriphosphorsäure, Adenosindesophosphorsäure und Adenosinmonophosphorsäure und das Energiepotential im Gewebe der Skelettmuskulatur nach Elektroschock behandelten Serums

Gruppe der Ratten	Nukleotidgehalt ($\mu\text{M/g}$ Gewebe)			Energiepotential (Bedingter Koeffizient)
	ATPh M+m	ADPh M+m	AMPh M+m	
I (physiologische Lösung – Kontrolle) n=10	7,55 \pm 0,19 (7,28-7,85)	0,95 \pm 0,12 (0,79-1,18)	0,25 \pm 0,08 (0,14-0,37)	0,917 \pm 0,080
II (Serum) n=10	7,89 \pm 0,12 (7,65 \pm 8,02)	1,12 \pm 0,11 (0,93-1,27)	0,14 \pm 0,05 (0,08-0,25)	0,923 \pm 0,125
III (physiologische Lösung + Schwimmen) n=10	1,34 \pm 0,08 (1,19-1,49)	3,56 \pm 0,17 (3,21-3,81)	0,78 \pm 0,07 (0,65-0,93)	0,549 \pm 0,140
IV (Serum + Schwimmen) n=10	4,78 \pm 0,17 (4,35-4,95)	2,55 \pm 0,11 (2,36-2,72)	0,33 \pm 0,09 (0,19-0,48)	0,790 \pm 0,095

Die Adenylsystemwerte im Wachzustand und 30 Minuten nach leichtem Stress aufgrund der durchgeführten Injektion (Kontrollgruppe) bestätigen, dass unter dem Serumeinfluss die Vermischung des Gehalts an Adenosintriphosphor- und Adenosindesophosphorsäure im Muskelgewebe zu den oberen Normwerten stattfindet, während sich der Adenosinmonophosphorsäuregehalt nach unten richtet.

Diese Ergebnisse könnten bedeuten, dass das Serum die Wachstumsprozesse der energetischen Reserve im Muskelgewebe vorantreibt. Die Berechnung des Energiepotentials bestätigt diese Tendenz.

Unter dem Einfluss einer extremen Schwimmbelastung in der dritten Gruppe (physiologische Lösung + Schwimmen) wurde eine Abnahme an Adenosintriphosphorsäure und eine Erhöhung des Gehalts an Adenosindesophosphor- und Adenosinmonophosphorsäure in Bezug auf die Kontrollgruppe festgestellt.

Bei der extremen Belastung der Ratten aus der vierten Gruppe (Serum + Schwimmen) blieben die grundsätzlichen Tendenzen in Zusammenhang mit der Werteveränderung der dritten Gruppe gleich, der Anteil an Adenosintriphosphorsäure blieb jedoch deutlich höher, und bei der Berechnung des Energiepotenzials wurde eine Erhöhung der Werte in Bezug auf die Werte der dritten Gruppe um 43% ($p < 0,05$) festgestellt.

Die Vergleichsanalyse der zyklischen Adenosintriphosphorsäure im Herz- und im Lebergewebe sowie in der Hirnsubstanz bei Ratten der ersten und zweiten Gruppe zeigte, dass unter Serumeinfluss eine Erhöhung des Gehalts der zyklischen Adenosinmonophosphorsäure in der Hirnsubstanz festzustellen ist ($p < 0,01$), während im Herz- und Lebergewebe keine bedeutenden Unterschiede zu den entsprechenden Daten der Kontrollgruppe (Tabelle 2) herausgefunden werden konnten.

Tabelle 2: Gehalt an zyklischer Adenosinmonophosphorsäure im Hirngewebe, des Herzens und der Leber nach der Beigabe des mit Elektroschock behandelten Serums

Gruppe der Ratten	Gehalt an zyklischer Adenosinmonophosphorsäure (pM/g Rohgewebe)		
	Gehirn M \pm m	Herz M \pm m	Leber M \pm m
I (physiologische Lösung – Kontrolle) n=10	3,95 \pm 0,58 (3,32-4,55)	3,07 \pm 0,11 (2,98-3,23)	2,75 \pm 0,18 (2,47-2,99)
II (Serum) n=10	4,58 \pm 0,23 (4,26-4,85)	3,26 \pm 0,16 (3,02-3,47)	2,98 \pm 0,99 (2,95-3,12)
III (physiologische Lösung + Schwimmen) n=10	0,82 \pm 0,13 (0,66-1,05)	0,49 \pm 0,17 (0,32-0,78)	1,01 \pm 0,07 (0,86-1,14)
IV Serum + Schwimmen) n=10	1,58 \pm 0,13 (1,38-1,76)	0,83 \pm 0,14 (0,56-0,96)	1,27 \pm 0,08 (1,14-1,41)

Unter dem Einfluss extremer Belastung wurde eine nachweisliche Senkung ($< 0,05$) des Gehalts an zyklischer Adenosinmonophosphorsäure bei allen Gewebsarten der Ratten der dritten Gruppe (physiologische Lösung + Schwimmen) sowie bei Ratten der vierten Gruppe (Serum + Schwimmen) festgestellt, was jedoch unter Serumeinfluss in einem geringeren Ausmaß der Fall war. Der Anteil an Adenosinmonophosphorsäure war daher in der Hirnsubstanz um 92% höher als der entsprechende Wert der dritten Gruppe ($p < 0,05$), im Herzgewebe um 69% und im Lebergewebe um 25,7%.

Somit ruft das mit Elektroschock behandelte Serum die Erhöhung des Energiepotenzials im Skelettmuskelgewebe der Ratte hervor, fördert die Erhöhung des Gehalts an zyklischer Adenosinmonophosphorsäure im Hirngewebe sowohl im Ruhezustand als auch unter extremer

physischer Belastung und begünstigt nach physischem Stress der Ratten den Anstieg an zyklischen Adenosinmonophosphorsäuren im Herz- und Lebergewebe.

2.2 Langzeitgedächtnis

Methode

Beim Versuch wurden 150 männliche Ratten der Linie Wistar eingesetzt. Alle Ratten wurden vorher im Rahmen des klassischen Tests "offenes Feld" geprüft, und je nach gezeigter Aktivität wurden sie in drei Gruppen – aktive, mittlere und passive – aufgeteilt.

Zur Bildung des Situationsreflexes wurden Ratten in einem Zylinder untergebracht, der sich in einem thermostatischen, mit Wasser befüllten Gefäß befand. Der auf drei Stützen aufgestellte Zylinder erlaubte es somit den Tieren, unter dessen unterer Kante durchzutauchen und die außerhalb des Zylinders liegende Plattform zu erreichen.

Feststellbar war eine Latenzzeit des ersten Versuchs und eine Latenzzeit der endgültigen Bewältigung der Aufgabe der "Befreiung" aus einem geschlossenen Raum und aus dem Wasser.

Beim Bilden des Situationsreflexes wurden die Ratten in drei Gruppen aufgeteilt:

- "schnelle Taucher": jene, die bereits in der ersten Minute den Ausgang finden konnten;
- "langsame Taucher": jene, die erst nach 2-3 Minuten begannen, den Ausgang zu suchen;
- Ratten, die die Aufgabe nicht innerhalb von 10 Minuten lösen wollten.

Die Injektion des mit Elektroschock behandelten Serums erfolgte in einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht 30 Minuten vor Beginn des Versuchs in die Bauchhöhle. Den Kontrolltieren wurde 1 ml der physiologischen Lösung verabreicht. Am nächsten Tag wurde das Reflexverhalten getestet, wonach es eine 42-tägige Pause gab.

Nach dieser Methode wurden 120 Ratten – 60 Kontroll- und 60 Versuchsratten – "ausgebildet", welche vorher in drei Gruppen – aktive, mittlere und passive- aufgeteilt wurden (zu je 20 Tieren in jeder Gruppe); ferner wurden diese für die Analyse in "schnelle und langsame Taucher" unterteilt.

Forschungsergebnisse

Bei manchen Ratten fehlte der "Untertauchreflex" zur Gänze (Tabelle 3). In der Kontrollgruppe waren es sechs der aktiven und mittleren Ratten, unter den passiven waren es 12 Tiere. Am zweiten Tag blieb diese Zahl bei den aktiven und mittleren Ratten gleich, bei den passiven fiel diese auf sieben Tiere, nach 42 Tagen wollten die gleichen 11 Ratten jedoch keineswegs erneut unter der Zylinderkante durchtauchen (eine Ratte starb während des Versuchs).

Bei den aktiven Ratten der Versuchsgruppe gab es gar keine Ratten, die am zweiten Tag darauf "verzichteten", die Aufgabe zu lösen. Bei den mittleren Ratten der Versuchsgruppe waren es am ersten Tag drei, am zweiten Tag lösten sie dennoch die Aufgabe und behielten diese

Fähigkeit auch noch nach 42 Tagen. Unter den passiven Ratten der Versuchsgruppe wollten vier Ratten die Aufgabe nicht lösen, am zweiten Tag reduzierte sich diese Zahl jedoch auf zwei und blieb auch nach 42 Tagen des Versuchs gleich.

Tabelle 3: Anzahl der Ratten, bei denen sich kein sog. "Untertauchreflex" gebildet hat

Versuchstiere	1 Tag (24 Stunden)			
		1	2	42
Aktive und mittlere Raten	Kontrolle	6	6	6
	Serum	3	0	0
Passive Raten	Kontrolle	12	7	11
	Serum	4	2	2

Bei den "schnellen Tauchern" führte die einmalige Seruminjektion innerhalb von 42 Versuchstagen zu keinen nachweislichen Veränderungen beim Aufrechterhalten des Situationsreflexes.

Bei den "langsamen Tauchern" war eine statistisch nachweisliche Aufrechterhaltung der erlernten Fähigkeiten, schnell den Ausweg aus einer Extremsituation zu finden, feststellbar (Tabelle 4). Dabei verkürzte sich die Zeit am zweiten Tag der Reflexbildung im Vergleich zum ersten Tag sowohl in den Kontroll- als auch in den Versuchsgruppen. In der Kontrollgruppe war dieser Reflex 42 Tage nach der Pause zur Gänze verschwunden, während er bei den Tieren, denen eine Injektion verabreicht worden war, vollständig vorhanden war; der Unterschied lag auch in der Zeit, die bei den Kontrollratten um das 2-3-fache ($p < 0,001$) ausgeprägter war.

Tabelle 4: Einfluss des Blutserums auf die Bildung und Aufrechterhaltung situationsbedingter Reflexe bei «langsamen Tauchern» (Sck.)

Versuchstiere	1 Tag (24 Stunden)						
	1			2		42	
		LP-1 (Latenzzeit-Periode)	LP-2	LP-1	LP-2	LP-1	LP-2
Aktive Gruppe	Kontrolle	125,7+25	176,7+19,6	45,5+9,9	59,0+8,8	37,5+30,0	181,5+15,5
	Serum	111,3+39,7	164,8+33,5	55,3+15,6	68,4+18,8	3,8+29,3	55,7+37,28
Mittlere Gruppe	Kontrolle	144,8+21,8	191,2+16,3	49,6+11,2	62+14,3	3,8+24,0	19,2+9,8
	Serum	118,2+71,6	178,6+76,8	3,8+50,3	77+54,1	9,2+28,8	54,6+39,7
Passive Gruppe	Kontrolle	53,3+25,7	189,6+12,6	53+15,0	66,6+8,0	149,3+24,7	196,0+11,1
	Serum	18,2+71,6	178,6+76,8	63,8+50,3	77+54,1	39,2+28,8	54,6+39,7

Bei der Bildung und beim langfristigen Behalten von Informationen kommt den H-cholinozeptiven Mechanismen eine bedeutende Rolle zu. 30 Tiere, denen fünf Tage lang beigebracht worden war, wie man unter einer "Glocke" durchtaucht, wurden in drei Gruppen unterteilt.

Den Tieren der ersten Gruppe (10 Ratten) wurde 30 Minuten vor dem Test Zytisin (H-cholinozeptive-Blocker des Hirns) in Form einer physiologischen Lösung in einer Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht in die Bauchhöhle injiziert.

Den Tieren der zweiten Gruppe (10 Ratten) wurde ein mit Elektroschock behandeltes Serum in einer Dosis von 100 mg/kg und 30 Minuten später eine Zytisin-Lösung in einer Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht verabreicht.

Der dritten Tiergruppe (Kontrolle – 10 Ratten) wurde eine physiologische Lösung in einer Dosis von 1 ml injiziert.

Das komplexe Verhalten der Tiere wurde nach der oben angeführten Methode 48 Stunden nach der Injektion der erwähnten Substanzen getestet. Die Biotestierung zeigte 48 Stunden, nachdem die Wirkung von Zytisin bemerkbar war, eine deutliche Verlangsamung der "Fluchtreaktion" aus einem geschlossenen Raum, und zwar um das Dreifache im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Die vorläufige Verabreichung des Serums bis zur Zytisin-Injektion hob nicht nur die Wirkung dieses Blockers auf, sondern rief auch einen Reaktionsanstieg beim "Flüchten" um 20% im Vergleich zur Kontrollgruppe hervor, und die allgemeine Wirksamkeit der Substanz übertraf die Wirkung des Blockers um das 5-fache (Tabelle 5).

Tabelle 5: Latenzzeit der situationsbedingten Reaktion bei Ratten in Zusammenhang mit von Zytisin und mit Elektroschock behandeltem Serum (Sek)

Zeitparameter	Kontrolle (dritte Gruppe)	Beigabe von Zytisin (erste Gruppe)	Beigabe von Serum+ Zytisin (zweite Gruppe)
Nach 48 St.	13,33±0,58	40,0±14 < 0,05	8,3±5,5 > 0,05 < 0,05

Auf Grund der erzielten Ergebnisse wurde festgestellt, dass die H- Hirncholinorezeptoren bei der Wiederherstellung der "Fluchtreaktion" im Zusammenhang mit dem Modellieren eines komplexen Verhaltens der Tiere eine Rolle spielen und dass das mit Elektroschock behandelte Serum der Entwicklung einer gebremsten "Lernwirkung" vorbeugt.

Das mit Elektroschock behandelte Blutserum fördert daher die Bildung des Langzeitgedächtnisses, und zwar vor allem bei Tieren mit einer verlangsamten "Fluchtreaktion" aus einem geschlossenen Raum und aus Wasser. Ferner spielt es beim Aufrechterhalten des Langzeitgedächtnisses über die H-cholinozeptiven Hirnmechanismen eine große Rolle.

2.3. Epilepsie

Methode

Nach heutigem Stand bewirkt Kampfer in toxischen Dosierungen die Hyperaktivierung der beweglichen Bereiche des Zentralnervensystems, was sich wiederum in der Entwicklung tonischer Krämpfe widerspiegelt. Aus diesem Grund wird Kampfer neben Korazol zur Generation von Krämpfen verwendet. Abhängig von der Dosis des verabreichten Präparates werden mit Hilfe von Kampfer sämtliche typische Komponente eines kleinen und großen epileptischen Anfalls hervorgerufen.

Bei unserem Versuch wurde der Einfluss eines mit Elektroschock behandelten Serums auf die epileptische Aktivität untersucht, welche durch Injizieren von Kampfer in die Bauchhöhle von Ratten hervorgerufen wird.

Beim Versuch wurden 40 männliche Ratten der Linie Wistar mit einem Gewicht von 190-210 g verwendet. Die Kampferlösung (20%) wurde in die Bauchhöhle in einer Dosis von 0,25; 0,5

ml (bei 20 Ratten) verabreicht. Das Serum wurde in einer Dosis von 100 +/- 5,0 mg/kg (bei 20 Ratten) injiziert.

Die Beobachtung wurde auf Grund der Expertenbeurteilung durchgeführt. Beurteilt wurden: die Latenzzeit der Reaktion, Art der Krampfreaktion (tonisch-klonische, große und kleine Krampfanfälle), die Dauer der epileptischen Anfälle und die Abstände zwischen ihnen, der Verlust der gewöhnlichen Bewegungsfähigkeit, das Endergebnis (Tod des Tieres oder das Verlassen des pathologischen Zustands).

Die Ergebnisse sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

Forschungsergebnisse

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen dargestellt.

Tabelle 6: Einfluss des mit Elektroschock behandelten Serums auf die experimentelle Epilepsie

Kampfer-Dosis	Epilepsieanfälle	Kontrollgruppe (Kampfer)	Versuchsgruppe (Kampfer + Serum in Dosierung 100 mg/kg)
0,25	Auftreten tonischer Krämpfe nach Auftreten klonischer Krämpfe in der Art eines großen Anfalls nach Mittlere Zahl der Anfälle Dauer des Anfalls Zustand der Tiere nach 48 Stunden	7'20"± 10" 12'30"± 32" einer in 6'-7' 70'-80' alle am Leben	5'30"± 15" 8'45"± 28" einer in 8' -9' 15"-20" alle am Leben
0,5 ml	Auftreten tonischer Krämpfe nach Auftreten klonischer Krämpfe in der Art eines großen Anfalls nach Mittlere Zahl der Anfälle Dauer des Anfalls Zustand der Tiere nach 48 Stunden	5'40"±30" 8'30"±27" einer in 5' 90"-120" 60% gestorben	5'00"±32" 8'40" einer in 7' 25"-30" alle am Leben

Das biologische aktive Serum in der Dosis 100 mg/kg, verabreicht in der Latenzzeit der epileptischen Krämpfe, die durch die Kampferinjektion ausgelöst werden, schwächt sämtliche

Erscheinungsformen der Krampfaktivität: die Latenzzeit der Krampfaktivität wird erhöht, die klonischen Krämpfe verlaufen schwächer und ohne Verlust der gewöhnlichen Bewegungsfähigkeit. Außerdem bewahrt das mit Elektroschock behandelte Serum die Tieren beim Modellieren von schweren Epilepsieformen vor dem Tod (alle Tiere bleiben nach Verabreichung von 0,5 ml der 20%-Kampferlösung am Leben).

2.4. Die Wirkung des erfindungsgemäßen Blutserums auf die Zellproliferation des Menschen

Das erfindungsgemäße Blutserum stellt ein lyophilisiertes, mit Elektroschock II. – III. Grades behandeltes Hühnerblutserum dar [Beresnjewa W.I., "Elektrotrauma, Elektroverbrennung und die Behandlung", M., 1964, S. 87]. Zwei Arten davon wurden bei den Tests verwendet: die erste – aufgelöst in Wasser in einer Konzentration von 100 mg/ml (Versuchsfraction 1), die zweite – nach dreiminütigem Zentrifugieren der Suspension bei 10000 x g (drei Minuten lang) (Versuchsfraction 2).

Zellgewinnung

Die Zellen der Jurkat- und Raji-Linie sowie Lymphozyten des menschlichen peripheren Bluts wurden in Kunststoffplatten (Nunc oder Falcon) im 1640-RPMI-Medium (Sigma) durch Zugabe des 10%-Rinderfetalsersums (Gibco), 100 Einheiten/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin bei einer Raumtemperatur von 37°C in einem CO₂-Inkubator mit 5% CO₂-Gehalt und bei 95% Feuchtigkeit kultiviert. Zellen der Linien Bro, HeLa, MCF-7, Mg63, HT1080, IMR-32 sowie HepG2 wurden ebenfalls kultiviert, jedoch im DMEM-Medium (Sigma).

Isolierung der mononuklearen Leukozyten (ML) nach der Boyum-Methode

[Boym A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood.// Scand J.Lab. Clin. Invest. – 1968. – 21 – Suppl. 97. – P.9-18]

In je zwei konische 50 ml Probiergläser (Falcon) wird eine 15 ml Phykoll-Pak-Lösung eingefüllt, worauf anschließend je 25 ml in einem Phosphatsalzpuffer (PSP) zweifach verdünntes Blut aufgetragen wird. Daraufhin werden die Probiergläser in einem Baket-Rotor bei 400 x g und 20°C 30 Minuten geschleudert. Die obere Phase, die Plasma enthält, kommt nicht zur Anwendung.

Die monoklearen Leukozyten (ML), die sich an der Trennlinie zwischen Plasma und Trennmedium ringförmig konzentrieren, werden im Zentrifugenreagenzglas gesammelt, vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt, in der Folge zweifach mit PSP gewaschen, wobei die Lösung bei 250 x g 10 Minuten geschleudert und im Kulturmedium aufgelöst wird. Diese Fraktion enthält 10-30% Monozyten und 80-90% Lymphozyten, die im Folgenden als Lymphozyten bezeichnet werden. Ein Teil der Lymphozyten wurde für die Erforschung der mitogenen Aktivität des Testpräparats verwendet und ein anderer zur Proliferation stimuliert, indem der Zellschlüssel Phytohemagglutinin in Konzentration 20 mkg/ml hinzugefügt wurde.

Evaluierung der Biosyntheseintensität Desoxyribonucleinsäure (DNS) in Zellen

Die Evaluierung der Biosyntheseintensität DNS wurde durchgeführt, nachdem der säureunlöslichen Zellfraktion ^3H -Thymidin hinzugefügt worden war. Zu diesem Zweck wurden Lymphozyten in 96-Well-Platten in 200 μl Medium zu je 200-800tausend Medium in jedem Well im Vollmedium mit unterschiedlicher Konzentration der Testsubstanz kultiviert. ^3H -Thymidin (1 μKi /Well, 40 mKi/mMol) wurde 2 Stunden vor Inkubationsschluss zugegeben. Für die Radiometrie wurden die Zellen mit Hilfe einer automatischen Vorrichtung für die Zellsammlung auf Filter gesammelt, die säurelöslichen Produkte mit 5% TH-Essigsäure (H_2O) gewaschen und ihre Radioaktivität mit Szintillometer gemessen. Die Biosyntheseintensität DNS wird in Imp./Min. gemessen.

Die Bestimmung der Zellebensfähigkeit nach Inkubation mit unterschiedlichen Präparaten mittels MTT-Test

[Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. // J. Immunol. Meth., 1983, 65, 55-63]

Zur Durchführung des Tests wurden die Zellen in einer logarithmischen Wachstumsphase gesammelt (Haftzellen, wenn sie etwa eine halbe Fläche der Nährplatte ausfüllen), in das Nährmedium gesetzt, in der Gorjaew-Kammer) gezählt und anschließend in einem Nährmedium mit einer Konzentration von 50-100tausend in 1 Mio. aufgelöst. Die Zelllösung wurde nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen zu je 100 μl in die 96-Wellplatten eingefügt. Für die Zählung der vitalen Zellen wurden nach Beendigung der Inkubation in diverse 96-Wellenplatten in sämtliche Wellen je 50 μl MTT-Lösung im Nährmedium (3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 Diphenyl Tetrazolium Bromid) zugefügt. Für die Herstellung einer MTT-Lösung wird 1 ml MTT-Ausgangslösung mit 4 ml Nährmedium vermischt. Die Zubereitung der MTT-Endlösung erfolgt durch die Auflösung dieser Substanz in einer Phosphatsalzlösung (PSL, 0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4, mit einem 0,15 M NaCl-Gehalt) mit einer Konzentration von 5 mg MTT/ml PSL und weitere Filtrierung durch einen Filter mit einem Porendurchmesser von 0,45 μm (die Lagerung erfolgt bei einer Temperatur von +4°C bis zu einem Monat). Nach dem Zufügen der MTT-Lösung werden die Platten unter den gleichen Bedingungen für weitere 4 Stunden in den Inkubator gestellt. Weiters wird durch das Absaugen mit der Pumpe das Nährmedium entfernt, in jedes Well werden je 150 μl Dimethylsulfoxid (DMSO) zur Auflösung von gebildeten blauen Formazankristallen zugegeben und die optische Dichte der Lösung in jedem Well auf einem Mehrkanalspektrofotometer für Mikroplatten bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen (Labsystem). Die Ergebnisse der Lebensfähigkeit der Zellen je nach Konzentration der Substanz werden in Prozenten des Überlebens der Kontrollzellen dargestellt. Die Daten wurden mit dem Computerprogramm "Origin" verarbeitet.

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse sind auf den Abbildungen 1 – 8 dargestellt. Daraus ergibt sich Folgendes: die hochkonzentrierte Substanz S1 (2,5 – 20 mg/ml) hat auf alle Zellen eine hemmende Wirkung, die Reaktion der Zellen verschiedener Gewebearten auf diese Substanz ist jedoch unterschiedlich. Die IC50 – Dosis (Konzentration der Substanz, die zur 50% Hemmung der Zellen führt) variiert bei unterschiedlichen Zelllinien von 2,2 (Jurkat) bis >20 mg/ml (Mg63) für die Ausgangssubstanz (Index 1) von 3,6 (Lymphozyten des peripheren Bluts) bis > 20 mg/ml (Mg 63 und HeLa) für die lösliche Fraktion der Substanz (Index 2). Bei sämtlichen Zelllinien lag die Toxizität der Ausgangssubstanz über jener der löslichen Substanz. Hier wäre jedoch zu erwähnen, dass für einzelne Linien die Toxizität dieser Formen fast gleich war (Mg63, Raji, Lymphozyten des peripheren Bluts), und für andere (Jurkat, MCG-7, IMR-32) wiederum gab es nach IC50 2-3-fach große Unterschiede. Die Gegenüberstellung der Empfindlichkeit der Zellen der Testsubstanz im Vergleich zum herkömmlichen Krebspräparat "Doxorubizin" finden Sie in der Tabelle 7.

Tabelle 7: Empfindlichkeit der getesteten Zelllinien auf das Präparat "Doxorubizin"

Zelllinie	IC50, hM*
Jurkat	100
Raji	20
Bro B-19	..**
HeLa	400
MCF-7	150
Mg63	..**
HT1080	..**
IMR-32	4
HepG2	100
Lymphozyten des peripheren Bluts	40

Anmerkung:

*- hM = 0,58 hg/ml

** - die Empfindlichkeit auf das Präparat "Doxorubizyn" wurde nicht getestet.

Ferner wurde beobachtet, dass in einem bestimmten Konzentrationsbereich (von 0,3 bis 3 mg/ml) je nach Zelllinie und Substanzform das Mittel auf bestimmte Zellen stimulierend wirkt. Eine stimulierende Wirkung wurde auch in Bezug auf die Jerkat-, Raji-, Bro-, Mg63-, HT1068- und HepG2-Zellen festgestellt. Die stimulierende Wirkung war unerheblich (10-20-40%), jedoch bei beiden Substanzformen vorhanden. Bei den Zellen der Linie HeLa, MCF-7,

JMR-32 und Lymphozyten des peripheren Bluts war keine stimulierende Wirkung nachzuweisen. Die stimulierende Wirkung der Ausgangssubstanz in einer Lösungsform war in einer viel niedrigeren Konzentration als in seiner löslichen Fraktion. Möglicherweise liegt der Grund für die zu beobachtende Stimulation nicht im eigentlichen Stimulieren der Proliferation, sondern in der verstärkten Atmung der Zellen, was ebenfalls bei der Methode zur Beurteilung der Lebensfähigkeit der Zellen festzustellen ist. Die letzte Frage bedarf einer genaueren Untersuchung.

Bei der Untersuchung der Wechselwirkungen verschiedener Substanzen mit den immunkompetenten Zellen werden in der Regel zwei Fragen erörtert:

1. Ob die Testsubstanz über eine mitogene Aktivität verfügt, d.h. über eine Fähigkeit, die Lymphozytenproliferation zu stimulieren (in diesem Fall ihre Mengenerhöhung, was üblicherweise nach der Verstärkung der Biosynthese der DNS-Lymphozyten, die nach dem Bestand von ^3H -Thymidin beurteilt, festgestellt wird).
2. Ob die Testsubstanz auf Lymphozyten eine toxische Wirkung ausübt (wird meistens beurteilt nach der Hemmung der Lymphozytenproliferation, die durch Mitogene mit ^3H -Thymidin-Gehalt oder mit Hilfe vitaler Farbstoffe des Typs MTT vorher stimuliert wurden).

Ferner ist zu erwähnen, dass die nicht aktivierten Lymphozyten in der Kultur nicht proliferieren und dass deren Zahl unter Einwirkung von Mitogenen bei ansteigender Mitogenkonzentration steigt. Dies drückt sich im Anstieg der markierten DNS aus.

Der Wirkungsgrad der Mitogene auf Lymphozyten wird je nach Dosis in einer s.g. "glockenförmigen" Kurve dargestellt (Abb. 9). Abschnitt (1) spiegelt jene Reichweite der Mitogenkonzentration wieder, bei der die ansteigende Wirkung (die Biosyntheseintensität DNS) im Verhältnis zur Mitogenkonzentration steht. Der zweite Kurvenabschnitt (2) zeigt den flach verlaufenden Abschnitt wieder und beinhaltet die Reichweite der Mitogenkonzentration, nämlich wann die höchste Wirkung bereits erreicht wurde, das Ansteigen der Mitogenkonzentration nicht durch Veränderung des erreichten Proliferationsniveau gekennzeichnet und keine zytotoxische Wirkung zu beobachten ist. Abschnitt (3) zeigt jenen Bereich der Mitogenkonzentration, in dem dieser bereits eine toxische Wirkung hat.

Die Beurteilung der mitogenen Aktivität der Substanz wurde in zwei Versuchen durchgeführt:

1. Gegenstand der Untersuchung war die Wirkung der Substanz auf die nicht aktivierten Lymphozyten des menschlichen peripheren Bluts. Dabei wurde die Abhängigkeit der proliferativen Aktivität (der Wirksamkeit) von der Dosis der Substanz getestet.
2. Gegenstand der durchgeführten Tests war die Wirkung der Substanz auf die Biosyntheseintensität DNS der mittels Phytohämaglytynyl aktivierten Lymphozyten (FHA 20 $\mu\text{g/ml}$) in der zweiten Phase.

Beim Untersuchen der Substanz wurde keine mitogene Aktivität festgestellt, d.h., dass im getesteten Bereich der Substanzkonzentration (0.1 – 100.0 mg/ml) keine Stimulation der Bio-

syntheseintensität Desoxyribonucleinsäure der Lymphozyten des peripheren Bluts erkennbar war (Abbildung 10).

Unabhängig von der Substanzdosis hat sich die Anzahl der Lymphozyten des peripheren Bluts nicht wesentlich verändert. Beim Untersuchen der Wirksamkeit der Substanz auf die mit Mitogen FHA 20 µkg/ml aktivierten Lymphozyten wurde die Hemmung der aktivierten Lymphozyten festgestellt.

In Rahmen der durchgeführten Tests wurde somit festgestellt, dass in einer Konzentration von über 0,3 mg/ml die Substanz die Biosyntheseintensität Desoxyribonucleinsäure der stimulierten Lymphozyten inhibieren kann (Abb. 11), obwohl die Frage über den Realisierungsmechanismus dieser Wirkung noch offen bleibt. Die Untersuchung der zytostatischen und der eigenen zytotoxischen Wirkung ist daher von Bedeutung.

Um festzustellen, wie die erhaltenen Daten beim Menschen zu werten sind, sollte man wissen, wie die Substanzkonzentration in den einzelnen Organen oder im Gewebe nach der Durchführung bestimmter Tierversuche aussieht. In diesem Zusammenhang ist es daher wichtig zu untersuchen, in welcher unterschiedlicher Konzentration die Substanz die Biosyntheseintensität DNS in Organen beeinflusst, die die Lymphopoese bestimmen, und zwar im Knochenmark, in der Milz und im Thymus der Maus.

Abgesehen von Lymphozyten wurde ebenfalls die zytotoxische Aktivität der Substanz untersucht, indem den Zellen das Karzinom der Milchdrüse der Linie MCF-7, die sich im Zustand einer monomolekularen Schicht befinden, hinzugefügt wurde. Auf Grund einer Kontaktbremsung der Zellen wurde keine Proliferation festgestellt. Bei einem solchen Modell kann man die toxische Wirkung der Substanz feststellen, d.h. diese von der zytostatischen Wirksamkeit trennen. Bei der Verwendung dieses Modells hat man festgestellt, dass die Substanz über eine eigene zytotoxische Wirkung bei einer Konzentration von über 2,5 mg/ml verfügt, unabhängig davon, ob die nichtlösliche Fraktion entfernt wurde oder nicht. Die Abhängigkeit von der Dosis ist jedoch sehr schwach ersichtlich. Zu erwähnen ist, dass bei der Inkubation mit den proliferierten Zellen die toxische Wirkung bedeutend schwächer ist, was möglicherweise damit in Zusammenhang steht, dass eine Wirkung innerhalb von 24 Stunden registriert wurde und nicht nach 72 Stunden, wie dies bei den proliferierten Zellen der Fall ist (eine längere Zellinkubation im Zustand einer monomolekularen Schicht kann zum Tod der Kontrollzellen führen).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Testsubstanz nicht nur über eine zytostatische Wirkung, sondern auch über eigene zytotoxische Aktivität verfügt. Die zytotoxische Aktivität war jedoch wesentlich geringer als die gesamte zytotoxische und zytostatische Aktivität, obwohl diese bei gleicher Konzentration beobachtet wurden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die aus tierischem Blut mit Elektroschock II.-III. Grades gewonnene Substanz S1 in der Dosierung 0,1 – 1,1 mg/ml eine um 10-40% höhere Proliferation der menschlichen Zellen der Linien Jurkat, Raji, Bro, Mg63, HT1068 und HegL2 hervorruft als jene der Kontrollgruppe. In Bezug auf die Zellen der Linien Hela,

MCF-7, JMR-32 und Lymphozyten des peripheren Bluts bewirkt die in höherer Dosierung verwendete Substanz (2,5 – 20 mg/ml) eine feststellbare Hemmung der Proliferation sämtlicher von uns untersuchten Krebszellen des Menschen. Die Sensibilität der Zellen gegenüber der Substanz S1 liegt deutlich höher als gegenüber dem bekannten tumorbekämpfenden Präparat Doxorubizin. Bezugnehmend auf den Einschluss von ^3H -Thymidin in die Biosynthese DNS hat die Substanz sowohl eine zytostatische als auch zytotoxische Wirkung.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Gewinnung eines biologisch aktiven Serums aus Spenderblut, welche die Elektrostimulation des Kopfes, Blutentnahme, Inkubation, Serumisolierung, Lyophilisierung des Serums und die darauffolgende Gammastrahlenbehandlung beinhaltet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Spenderblut das Blut von Geflügel, insbesondere von Hühnern eingesetzt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass nach einer 3 bis 4 Sekunden dauernden Elektrostimulation des Hühnerkopfes im Bereich von 80 bis 120 Volt, bevorzugt im Bereich von 110 bis 120 Volt das Blut entnommen wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass Co^{60} für die Bestrahlung im $25 \pm 5,0$ kGy – Bereich verwendet wird.
5. Blutserum, das aus Arterien- und Venenblut gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 gewonnen wird, insbesondere aus dem Arterien- und Venenblut von Geflügel.
6. Blutserum nach Anspruch 5, mit einer biologischen Aktivität in einer Konzentration von 95 mg/kg bis 105 mg/kg des Körpergewichts des Spendertieres.
7. Blutserum nach Anspruch 5 oder 6, das den Energiewechsel und den Gehalt an zyklischer Adenosinmonophosphorsäure im Hirngewebe erhöht, den Lern- und Bildungsprozess des Langzeitgedächtnisses fördert, die Krampfaktivität senkt und bei schweren Epilepsieformen vor dem Tod schützt.
8. Blutserum nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass es sowohl eine zytostatische, als auch eine zytotoxische Aktivität besitzt.
9. Blutserum nach einem der Ansprüche 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensibilität der Zellen des humanen T-Zell-Lymphoms der Linie Jurkat, Zellen des humanen B-Zell-Lymphoms der Linie Raj, Zellen der humanen Melanomzellen der Linie Bro, Zellen des Gebärmutterhalskarzinoms der Linie HeLa, Zellen des Adenokarzinoms der Milchdrüse der Linie MCF-7, Zellen des Osteosarkoms der Linie Mg63 und des Fibrosarkoms der Linie HT1080, Zellen des Neuroblastoms IMR-32 und des Hepatokarzinoms der Linie HepG2 gegenüber der Substanz S1 höher liegen als im Vergleichsfall mit Doxorubizin.
10. Pharmazeutische Zusammensetzung, die eine effektive Menge an Blutserum gemäß einem der Ansprüche 5 bis 9 enthält und gemäß einer der in den Ansprüchen 1 bis 4 dargelegten Methode hergestellt wird, und bei Bedarf zusätzlich auch ein pharmazeutisch vertretbares Medium, Füllungs- bzw. Lösungsmittel enthält.
11. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 10, die den Energiewechsel und den Gehalt an zyklischer Adenosinmonophosphorsäure im Hirngewebe erhöht, den

Lern- und Bildungsprozess des Langzeitgedächtnisses fördert, die Krampfaktivität senkt und bei schweren Epilepsieformen vor dem Tod schützt .

12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 10 oder 11, die in Lösungs-, Tabletten-, Zäpfchen-, Pulver- oder Kapselform hergestellt ist.
13. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 10 bis 12 unter Verwendung von destilliertem Wasser als Lösungsmittel.
14. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 10 bis 12 unter Verwendung von Kakaobutter, Vitebsol als Trägersubstanz.
15. Verfahren zur Erhöhung des Energiwechsels und des Gehaltes an zyklischer Adenosinmonophosphorsäure im Hirngewebe durch Zuführung eines Blutserums gemäß einem der Ansprüche 5 bis 9 oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 10 bis 14.
16. Verfahren nach Anspruch 15, bei der die Effektivdosis von 95 bis 105 mg/kg Körpergewicht des Patienten beträgt.
17. Verfahren zur Förderung des Lern- und Bildungsprozess des Langzeitgedächtnisses durch Zuführung eines Blutserums gemäß einem der Ansprüche 5 bis 9 oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 10 bis 14.
18. Verfahren nach Anspruch 17, bei der die Effektivdosis von 95 bis 105 mg/kg Körpergewicht des Patienten beträgt.
19. Verfahren zur Senkung der Krampfaktivität und zum Schutz vor dem Tod bei schwerem Epilepsiegrad, gekennzeichnet durch die Zuführung einer pharmazeutischen Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 10 bis 14.
20. Verfahren nach Anspruch 19, bei der die Effektivdosis von 95 bis 105 mg/kg Körpergewicht des Patienten beträgt.
21. Verwendung eines Blutserums nach einem der Ansprüche 5 bis 9 oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 10 bis 14, zur Regulierung der Proliferation unterschiedlicher menschlicher Tumorzellen, vergleichbar den Zellen des humanen T-Zell-Lymphoms der Linie Jurkat, Zellen des humanen B-Zell-Lymphoms der Linie Raj, Zellen der humanen Melanomzellen der Linie Bro, Zellen des Gebärmutterhalskarzinoms der Linie HeLa, Zellen des Adenokarzinoms der Milchdrüse der Linie MCF-7, Zellen des Osteosarkoms der Linie Mg63 und des Fibrosarkoms der Linie HT1080, Zellen des Neuroblastoms IMR-32 und des Hepatokarzinoms der Linie HepG2.
22. Verwendung eines Blutserums nach einem der Ansprüche 5 bis 9 zur Regulierung der Proliferation unterschiedlicher menschlicher Tumorzellen nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass zur Stimulierung der Zellproliferation eine Dosierung von 0,1 –

1,1 mg/ml Flüssigkeitsmenge und zur Hemmung eine Dosis von 2,5 – 20 mg/ml Flüssigkeitsmenge eingesetzt wird.

23. Verwendung eines Blutserums nach einem der Ansprüche 5 bis 9 zur Regulierung der Proliferation unterschiedlicher menschlicher Tumorzellen vergleichbar den Zellen der Linie Hela, MCF-7, JMR-32 und Lymphozyten des peripheren Bluts nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass es in einer Dosierung von über 2,5 mg/ml Flüssigkeitsmenge eingesetzt wird.

2003 12 18

Ba/Ka

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Erfindung gehört zur Medizin und wird zur Gewinnung eines biologisch aktiven und mit Elektroschock behandelten Blutserums verwendet, welches sich bei einigen Erkrankungen und Störungen des menschlichen und tierischen Organismus als nützlich erweist (Energiewechsel und Gehalt an zyklischer Adenosinmonophosphorsäure im Hirngewebe, Langzeitgedächtnis, Epilepsie usw.) Weiters wird die Verwendung des erfindungsgemäßen Blutserums zur Regulierung der Proliferation unterschiedlicher menschlicher Tumorzellen behandelt.

(Abb. 1)

1/11

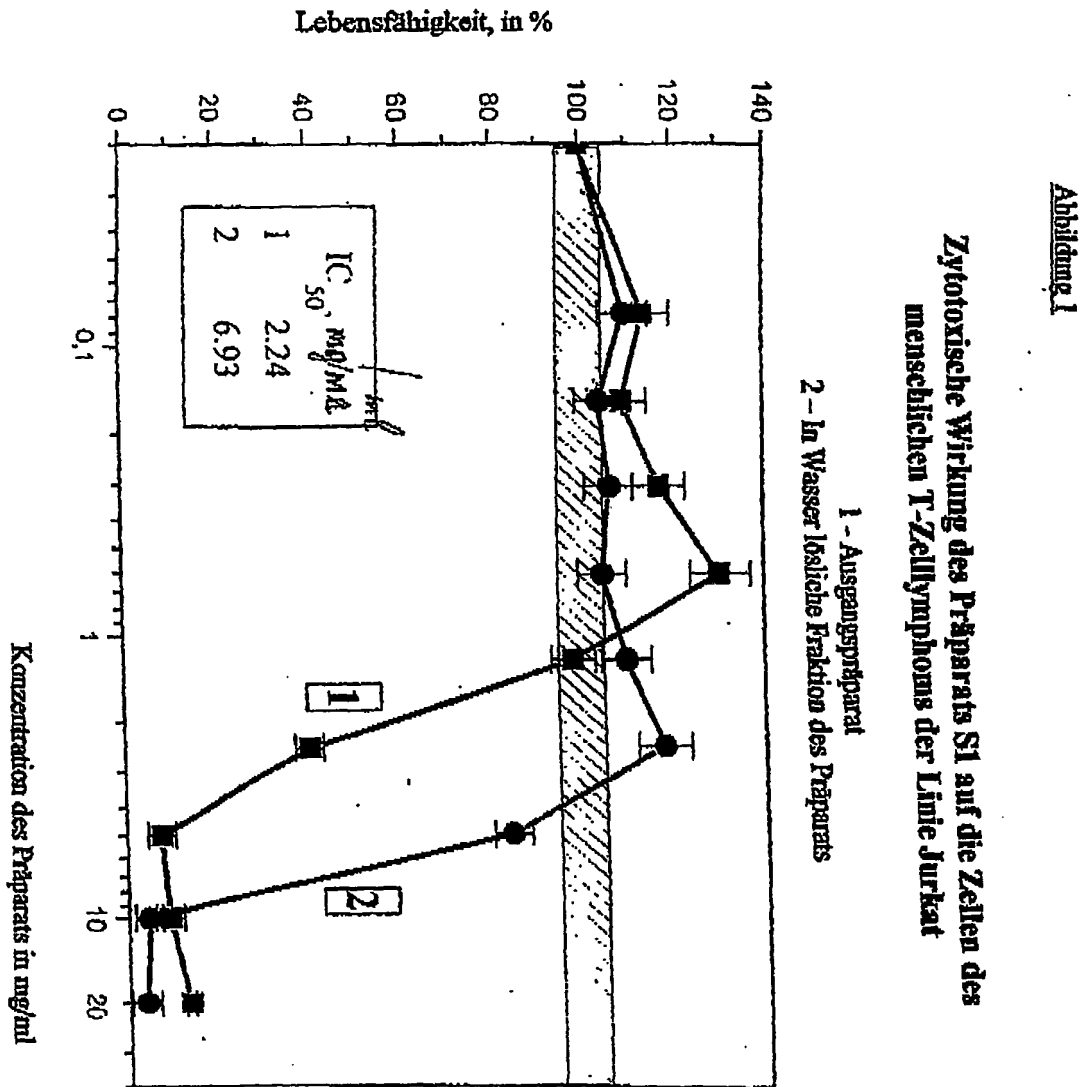


Abbildung 2

Zytotoxische Wirkung des Präparats S1 auf die Zellen des menschlichen
B-Zelllymphoms der Linie Raji

1 - Ausgangspräparat
2 - In Wasser lösliche Fraktion des Präparats

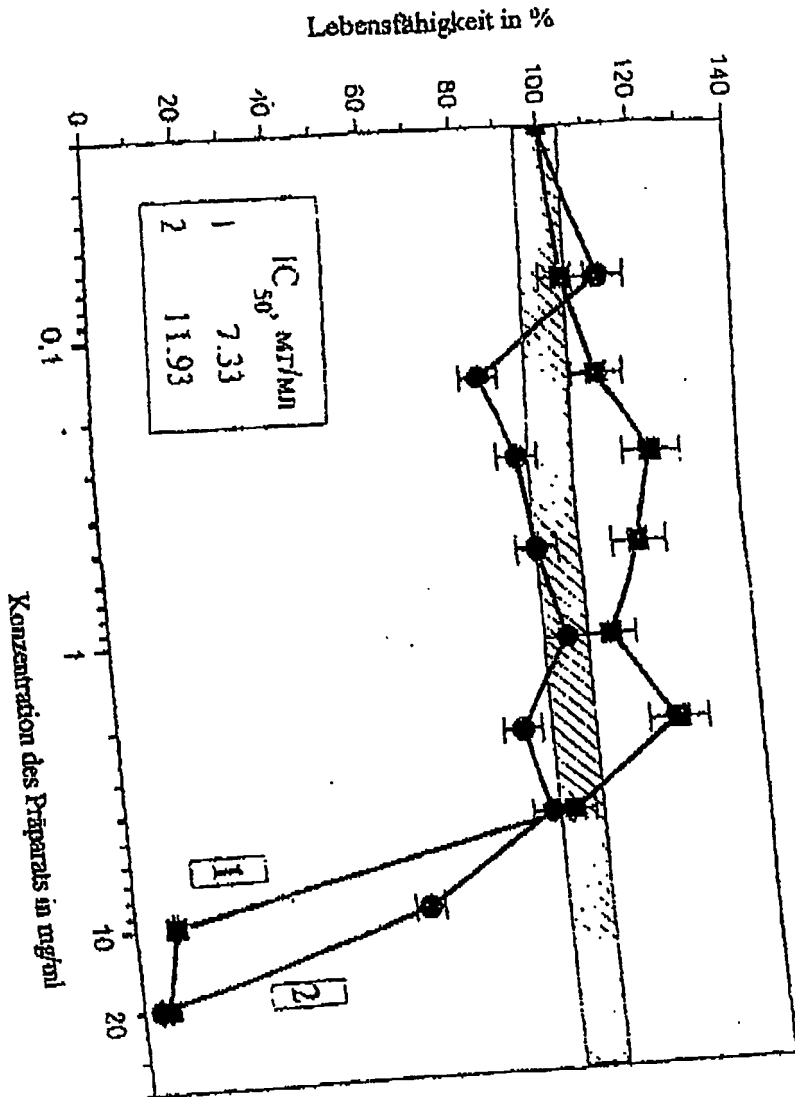


Abbildung 3

Zytotoxische Wirkung des Präparats S1 auf die Zellen des
menschlichen Gebärmutterkarzinoms der Linie Bro B-19

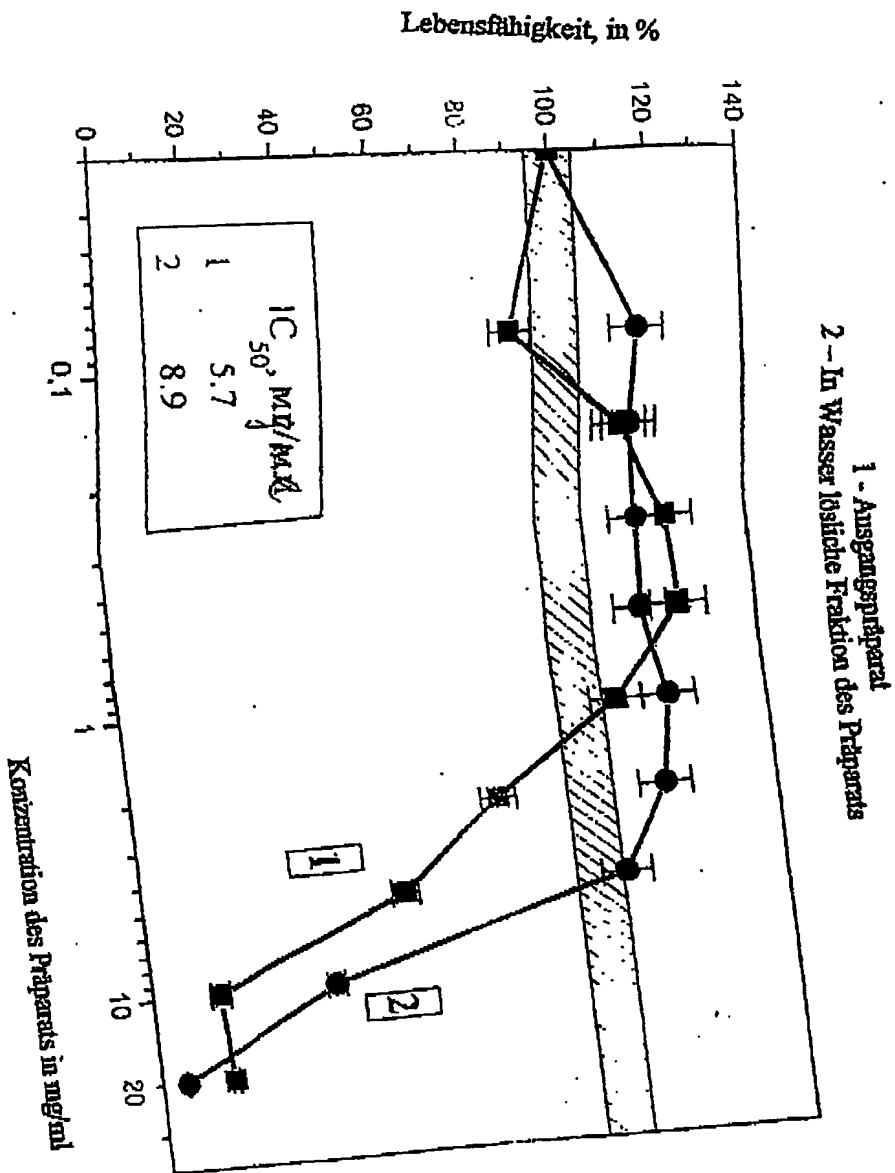


Abbildung 4

Zytotoxische Wirkung des Präparats S1 auf die Zellen des menschlichen Gebärmutterkarzinoms der Linie HELA

1 - Ausgangspräparat
2 - In Wasser lösliche Fraktion des Präparats

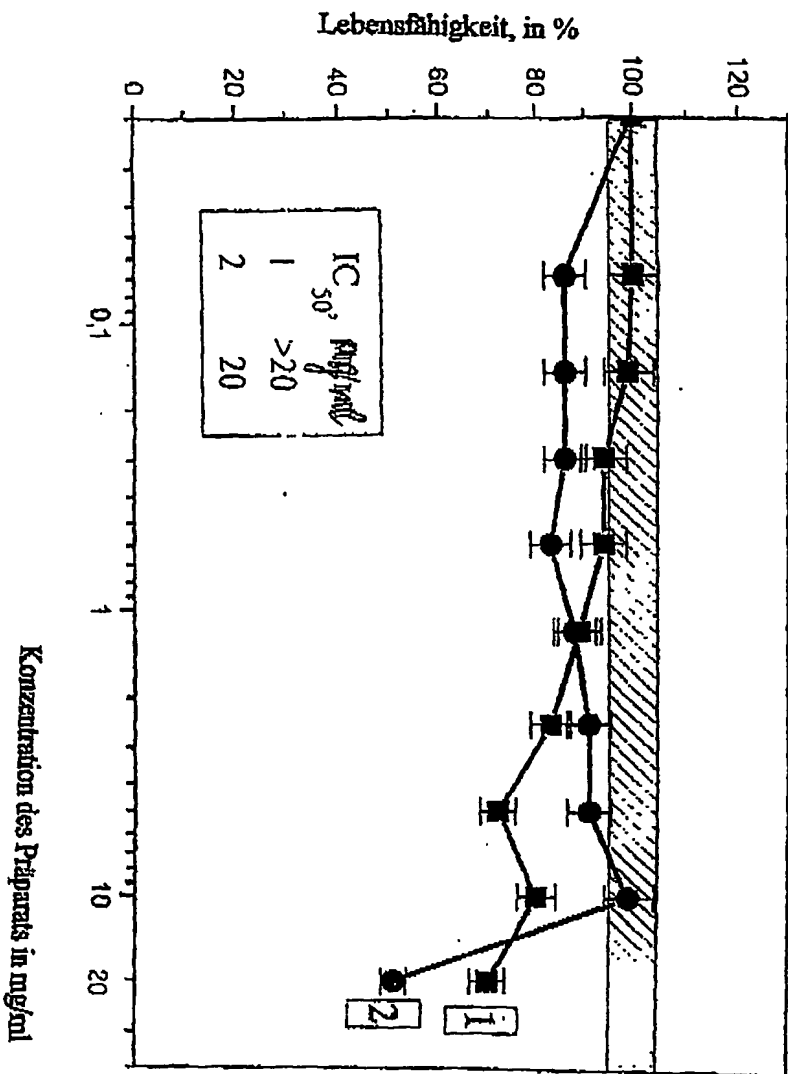


Abbildung 5

Zytotoxische Wirkung des Präparats S1 auf die Zellen des
menschlichen Milchdrüsenkarzinoms der Linie MCF-7

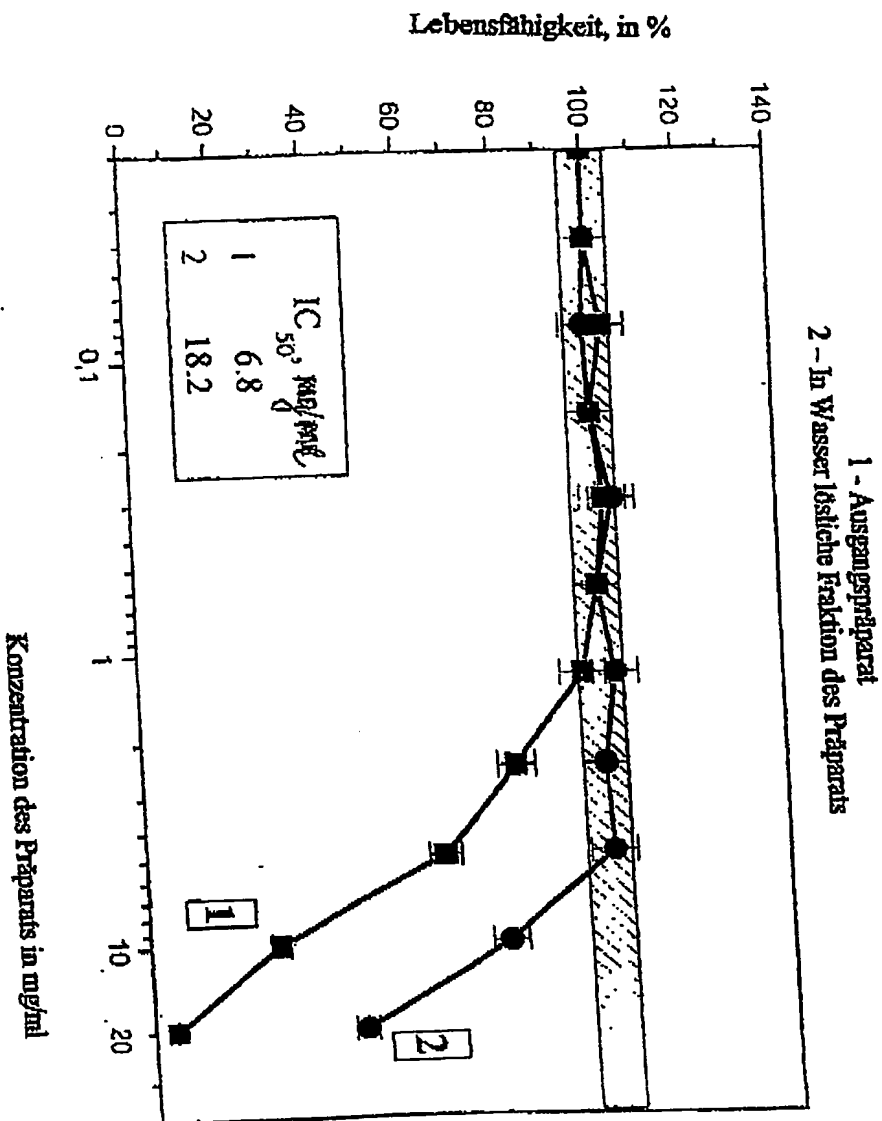


Abbildung 6

Zytotoxische Wirkung des Präparats S1 auf die Zellen des menschlichen Neuroblastoms der Linie IMR-32

1 - Ausgangspräparat

2 - In Wasser lösliche Fraktion des Präparats

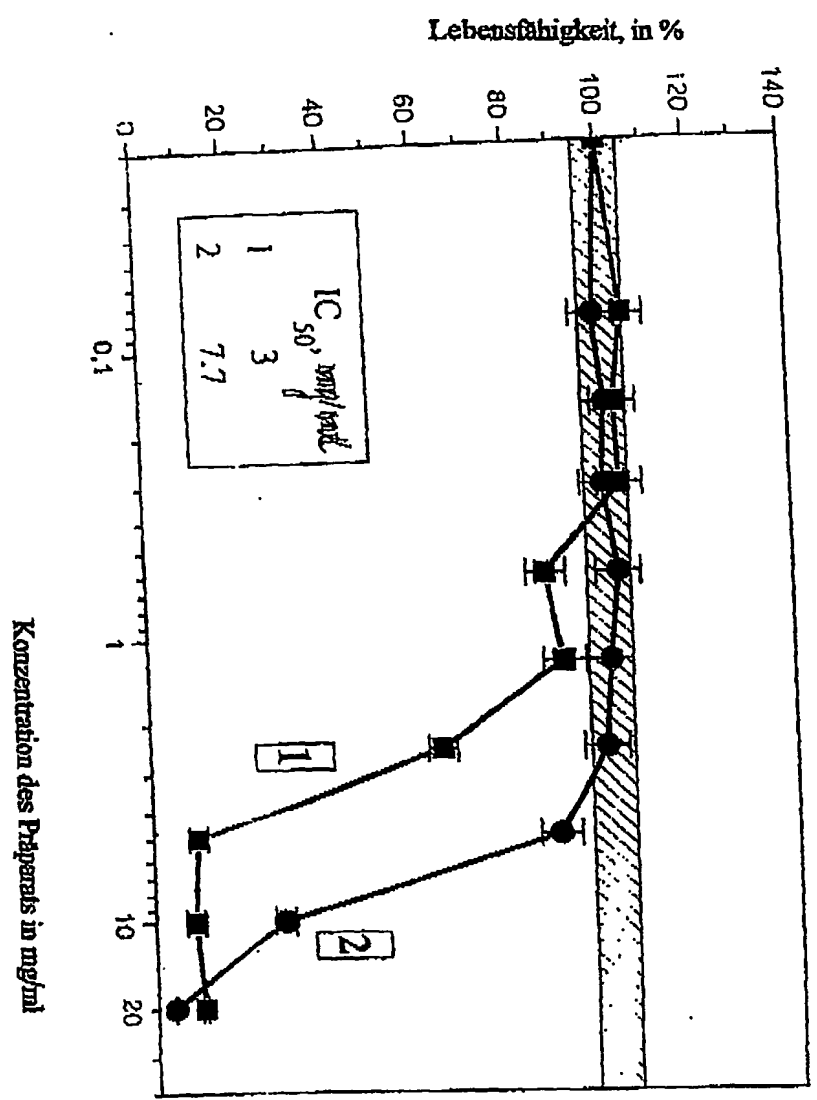


Abbildung 7

Zytotoxische Wirkung des Präparats S1 auf die Zellen des
menschlichen Fibrosarkoms der Linie HT1080

1 - Ausgangspräparat
2 - In Wasser lösliche Fraktion des Präparats

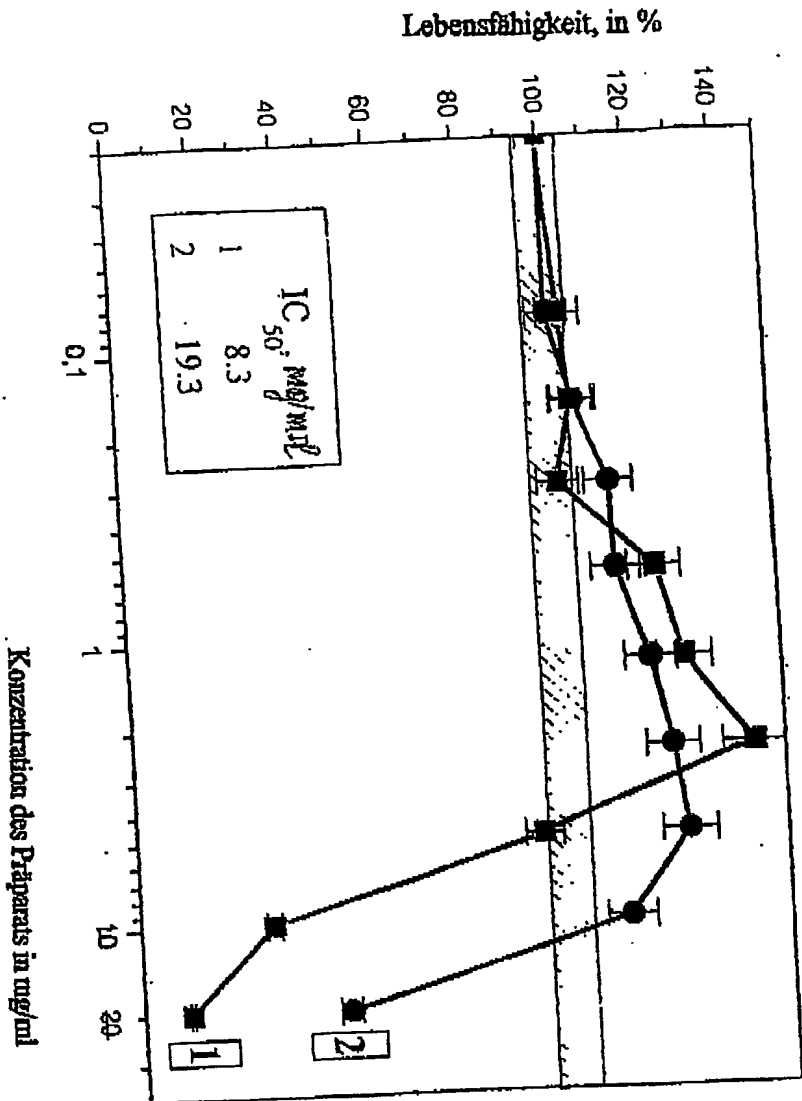
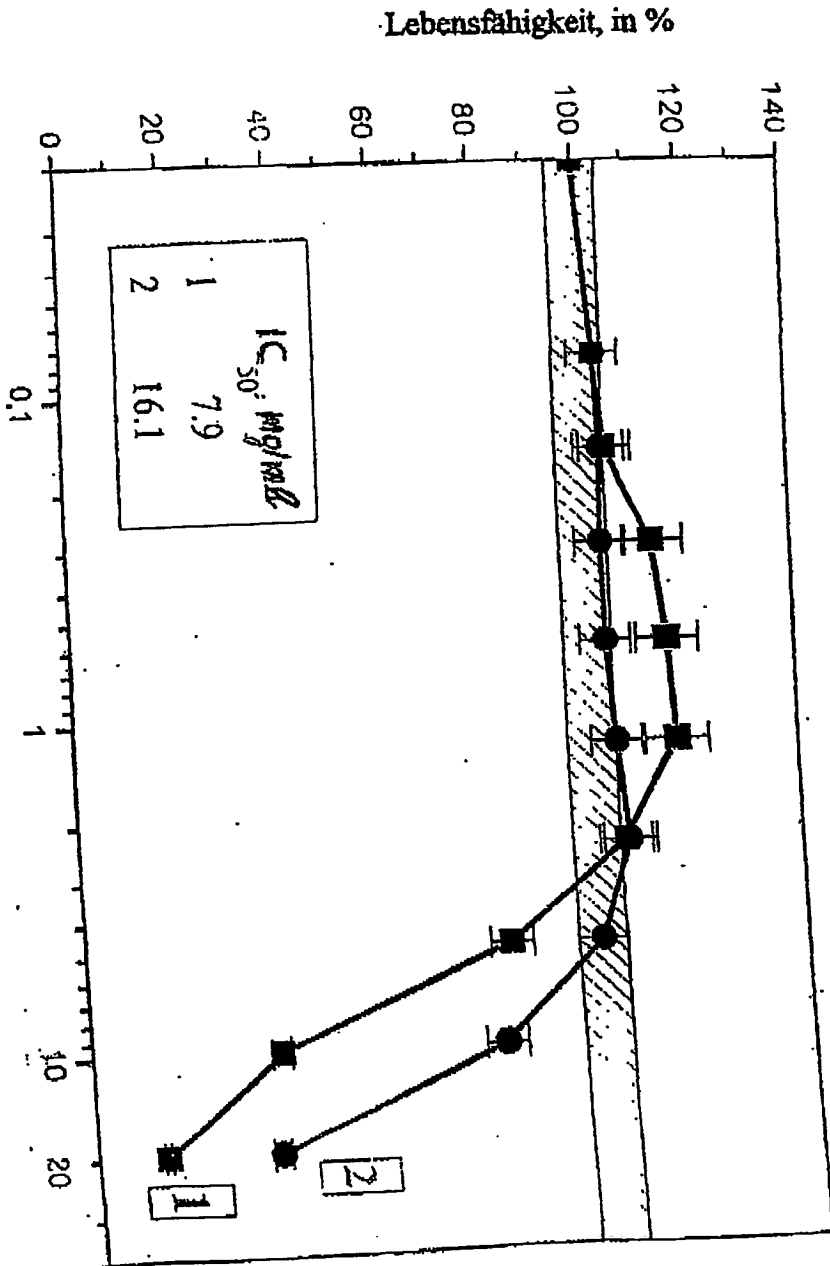


Abbildung 8

Zytotoxische Wirkung des Präparats S1 auf die Zellen des
menschlichen Hepatoms der Linie HepG2

1 - Ausgangspräparat
2 - In Wasser lösliche Fraktion des Präparats



Konzentration des Präparats in mg/ml

Intensität der Biosynthese DNS

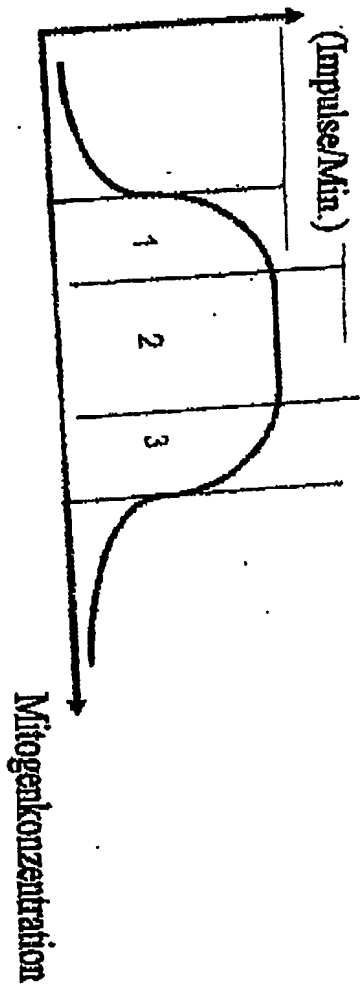


Abbildung 9
Konzeption der Biosynthese DNS in Abhängigkeit von der
Mitogenkonzentration

10/11

Intensität der Biosynthese DNS (Impulse/Min.)

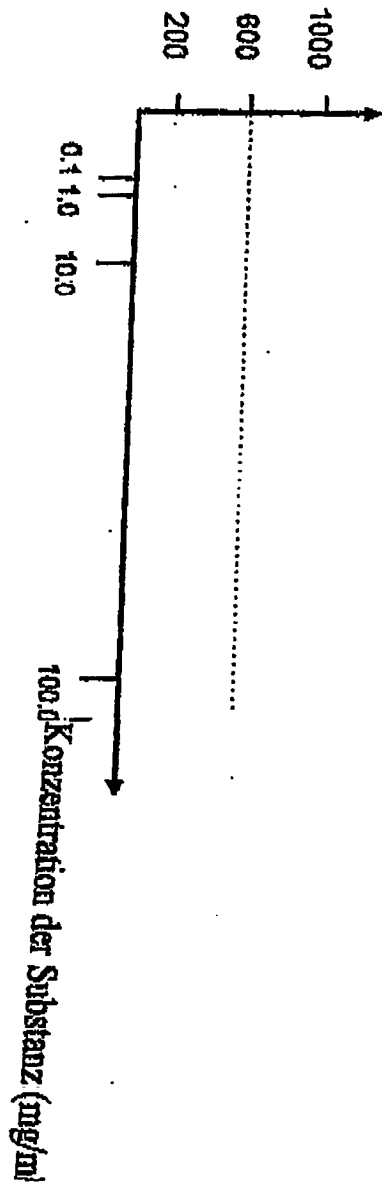


Abbildung 10

Mitogene Aktivität der Substanz SI.

11/11

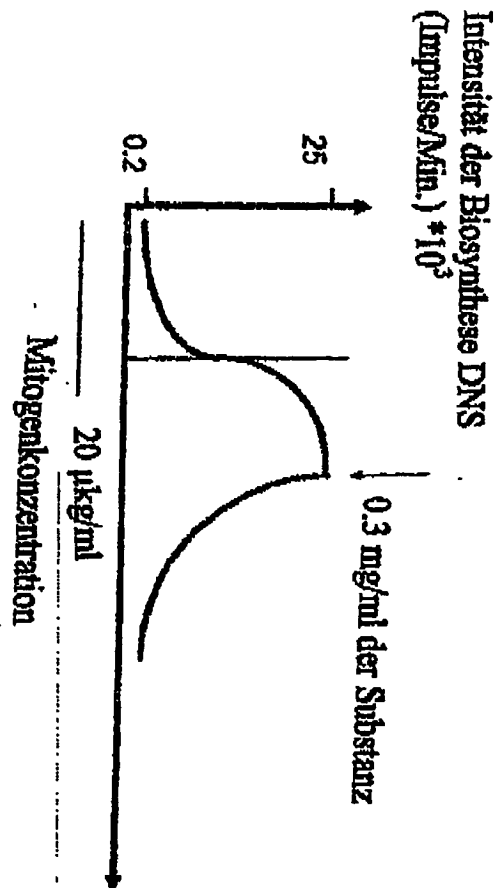


Abbildung 11
Einfluss der Substanz S1 auf die Biosynthesedynamik DNS
der Zellen des Milchdrüsenkarzinoms.
MCF - 7

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP04/014510

International filing date: 20 December 2004 (20.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP
Number: PCT/EP03/14578
Filing date: 18 December 2003 (18.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 09 February 2005 (09.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.